云 南 植 物 研 究 2002，24（4）：508～514
Acta Botanica Yunnanica

# 黄瓜和绿豆下胚轴不定根发生的研究*

王利琳[1,2]，庞基良[2]，胡江琴[2]，梁海曼[1]
（1 浙江大学生命科学学院，浙江 杭州 310012；2 杭州师范学院生命科学学院，浙江 杭州 310036）

**摘要**：在 MS 基本培养基上，黄瓜和绿豆幼苗的下胚轴切段培养 4 d 时即可见不定根发生。下胚轴不同部位切段的发根能力不同。下胚轴切段反插时比正插时发根快 1～2 d，发根率也高于正插的；0.01～0.05 mg/L 的 NAA 还诱导下胚轴切段在形态学上端发根。TIBA 对正插或反插的下胚轴切段的不定根发生都有抑制作用。结果提示，生长素极性运输活性对不定根形成起着重要作用。

**关键词**：不定根；下胚轴；IAA 极性运输；黄瓜；绿豆
**中图分类号**：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2002)04－0508－07

# Studies on Adventitious Root Formation in Hypocotyls of Cucumber and Phaseolus Cultured *in Vitro*

WANG Li-Lin[1,2]，PANG Ji-Liang[2]，HU Jiang-Qin[2]，LIANG Hai-Man[1]
(1 *College of Life Sciences*，*Zhejiang University*，Hangzhou 310012，China；
2 *School of Life Sciences*，*Hangzhou Normal College*，Hangzhou 310036，China)

**Abstract**：Hypocotyls from Cucumber and Phaseolus inoculated on Murashige and Skoog（MS）culture medium for 4 days，formed adventitious roots on morphologically lower side. The rooting capacity of each segment derived from three regions of each hypocotyl was different. The rooting speed on the morphologically lower side of segments which were inserted upside down is faster for one day to two days than which were inserted upright in the culture medium. Adventitious root can also formed on the morphologically higher side on the culture medium supplemented with different concentration of NAA 0.01～0.05 mg/L. No matter upright or upside down the hypocotyls are inserted，the rooting capacity is greatly inhibited by 2，3，5-triiodobenzoic acid. The result shows that auxin-polar-transport plays an important role in adventitious root formation.

**Key words**：Adventitious root formation；Hypocotyl；IAA polar transport；Cucumber；Phaseolus

不定根是指在植物生长到一定阶段或在一定条件下，从植物茎、叶或地下茎及较老的根的射线细胞而非中柱鞘细胞所发生的根，发生部位不定。不定根的发生问题不仅在大田作物、林木、花卉移栽和苗木扦插中经常遇到，而且在植物组织培养中也同样广泛存在，

* 基金项目：浙江省自然科学基金资助项目（300030）和杭州师范学院科研基金资助项目（2000XB308）
收稿日期：2001－10－16，2002－01－29 接受发表
作者简介：王利琳（1965－）男，浙江人，副教授，在读博士研究生，主要从事植物生理学研究。

因而不定根发生的确切规律一直受到人们的关注。在离体条件下研究不定根的发生，有助于弄清不定根发生的条件和发根规律。迄今，已从苹果（Pelosi，1995）、向日葵（Vesperinas，1998）、大白菜（李小芳等，2000）、黄瓜（王利琳等，2000）、甜瓜（田长恩等，1998）等众多植物上进行过研究，所用的外植体主要有子叶、胚芽、叶柄、叶片、下胚轴等，研究内容涉及到培养基成分、激素、培养条件、成花（Devier 等，1997）对不定根发生的影响，以及不定根发生过程中组织和细胞学特征、各种生理变化、相关基因表达等，取得了大量有价值的研究结果。

Jarvis 等（1983）曾经对绿豆幼苗子叶发生不定根的情况进行过较为详尽的研究，我们也对黄瓜子叶培养物的不定根形成进行过研究（王利琳等，2000）。最近我们在用这两种材料的下胚轴切段培养物添加 NAA、TIBA 以诱导不定根发生时，又发现了一些新的有意义的线索，并在一定程度上有助于探讨不定根发生的规律。

## 1　材料与方法

黄瓜（*Cucumis sativus* L.）“早丰一号”和市售绿豆（*Vigna radiata* R. Wilozak）种子经漂浮去瘪后，用 0.1 %升汞消毒 10 min，于无菌条件下接种于育苗培养基中，育苗培养基为 2.0 mg/L $KNO_3$，1.0 mg/L $CaCl_2$，0.5 mg/L $KH_2PO_4$，0.2 mg/L $MgSO_4$，MS 培养基的 Fe 盐和微量元素，pH 值调至 5.8，附加 0.7 % 琼脂。先在 28℃下黑暗培养 48 h，然后转入 25℃、每天光照 10 h 条件下继续培养。

选取培养 4～5 d 的无菌幼苗，取其下胚轴并切割成上、中、下 3 段，每个切段长度为 1 cm 左右。切段接种于培养基时，采用正插（即形态学下端插入培养基）和反插（即形态学上端插入培养基）两种处理，每天照光 10 h。基本培养基配方与育苗培养基相同，诱导不定根时附加不同浓度的 NAA，检验内源生长素状况对不定根发生的影响时附加不同浓度的 TIBA。以不附加任何生长调节剂的培养基作为空白对照。培养温度为 25±2℃，光照强度 2000 lx 左右。每种处理的接种切段数不少于 20 个，试验重复 5 次以上。

## 2　结果与分析

### 2.1　下胚轴不定根发生的形态观察

黄瓜和绿豆下胚轴切段在无激素的对照培养基上培养，最早在培养第 3 天时可见在形态学下端切口处周围出现数个白色小突起，第 4 天时这些小突起已伸长至 3～4 mm，从形态上可明显识别为不定根。以后，不定根生长速度较快，长可达 10 cm 以上。正插时形态学下端所发生的不定根较粗短，上有侧根。培养基中附加有 NAA 时，随 NAA 浓度的提高，不定根变得粗壮，类似棉纱线，且少有侧根（图 1：A）。反插时形态学下端所发生的不定根较细长，上有大量侧根（图 1：B）无激素条件下，各切段的形态学上端均未见有不定根发生。

我们注意观察统计了不同处理下不定根发生在时间上的差异，反插时形态学下端发根比正插的早 1～2 d，黑暗培养比光照培养早 1 d 左右。

### 2.2　下胚轴不同部位切段不定根发生能力的差异

取下胚轴的上、中、下 3 种切段，分别正向插入 MS 基本培养基，比较了不同部位切段不定根发生能力的差异。结果（表 1）显示，除黄瓜下胚轴下切段发根率较低（83.5%）外，其余各切段的发根率均较高，且相差不大。但来源于不同部位的切段的发根

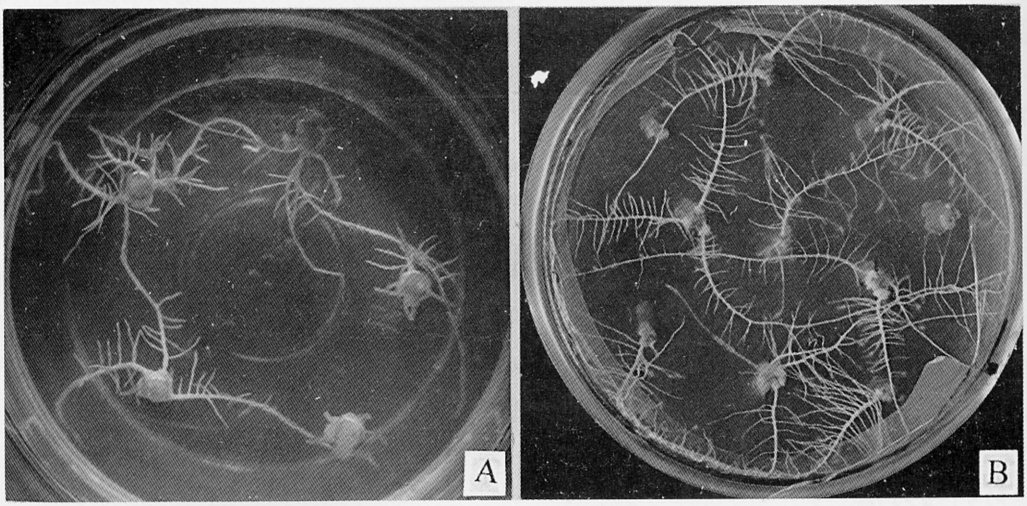


图 1 A. 下胚轴正插时的不定根较粗壮，侧根较小；B. 下胚轴反插时的不定根较细长，侧根较多

Fig. 1 A. Adventitious roots formed on hypocotyls inserted upright were comparatively stronger and shorter, and had less lateral roots; B. Adventitious roots formed on hypocotyls inserted upside-down were comparatively slim and had more lateral roots.

数却有 1.3 倍至 2 倍的显著差异，2 种植物材料上段的发根数和总发根能力均明显高于下段。表 1 中绿豆下胚轴的发根率与发根数情况还表明，发根率高并不代表发根数也多。以上事实提示下胚轴发根能力与内源 IAA 水平梯度并不呈简单相关。

**表 1 下胚轴不同部位切段形态学下端不定根发生能力的差异**

Table 1 Difference of rooting capacity in different region of the hypocotyls segments

| 发根能力 Rooting capacity | 黄瓜（*Cucumis sativus* L.） | | | 绿豆（*Viga radiata* R. Wilozak） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 上段 Apical segment | 中段 Middle segment | 下段 Basal segment | 上段 Apical segment | 中段 Middle segment | 下段 Basal segment |
| 发根率/% | 95.2 ± 4.6 | 88.8 ± 3.4 | 83.5 ± 3.7 | 91.5 ± 5.1 | 96.0 ± 5.5 | 98.2 ± 4.7 |
| 发根数/发根切段 | 5.6 ± 0.7 | 3.7 ± 0.2 | 2.8 ± 0.1 | 3.9 ± 0.5 | 3.2 ± 0.3 | 2.9 ± 0.2 |
| 总发根数/100 个切段 | 533.12 | 328.56 | 233.80 | 356.85 | 307.20 | 284.78 |

注：培养 6 d 时统计数据。Note: Data calculated at the 6th day after culture.

## 2.3 下胚轴不同插向与不定根发生的关系

生长素在植物茎（胚轴）内一般由形态学上端向形态学下端作极性运输，从而使茎内生长素的含量水平由上而下呈梯度分布。黄瓜和绿豆下胚轴不同部位发根能力的研究结果（表 1）提示，下胚轴不定根的发生似乎不仅仅简单地与内源生长素含量梯度相关。为了进一步探究其原因，我们取下胚轴的中间切段，在不添加 NAA 的 MS 基本培养基上分别作了正插和反插二种处理试验，结果如表 2。从表 2 和对不定根发生进程的观察记录得到：(1) 下胚轴反插时，不定根发生率整体上要高于正插的。而且，反插时，下段发根数高于中段，中段又高于上段，表现得很有规律。(2) 无论是黄瓜还是绿豆，反插时下胚轴不定

根发生在时间上均明显快于正插，如在培养第 4 d，黄瓜下胚轴反插时不定根发生率已达 20%，而正插时却仍为零；绿豆下胚轴反插时已达 100%，而正插时还只有 20%。培养 6 d 时，二者正插的不定根发生率才接近反插时的水平。我们仔细观察记录了每一批次试验的情况，显示切段反插时总比正插的发根早 1~2 d。（3）在 MS 基本培养基上，无论切段是正插还是反插，不定根都只能在切段的形态学下端发生。

## 2.4　NAA 和 TIBA 对下胚轴不定根发生的诱导作用

上述不定根只能在下胚轴形态学下端发生的实验结果提示，不定根的发生位置显著受到下胚轴切段形态学部位的影响。为了验证这种极性现象的产生是否与内源生长素的极性运输存在某种关联，我们进一步进行了培养基中添加不同浓度 NAA 和 TIBA（生长素极性运输抑制剂）对下胚轴切段（取中段做试验）不定根发生的影响的试验，结果表明外源 NAA 和 TIBA 对黄瓜和绿豆下胚轴切段发根的影响基本上是相同的。表 3 显示，在 NAA 0~0.01 mg/L 范围内，正插的下胚轴切段只能在其形态学下端发根；当 NAA 提高到 0.01 mg/L 以上时，反插的下胚轴切段可在其形态学上下两端均发生不定根，只是形态学上端发根在时间上迟于形态学下端发根。另外，形态学上端的发根率有随 NAA 浓度提高而增加的趋势，最高可达 100%。这表明正插时 NAA 不可能逆极性向上运输而作用于形态学上端使之发根，反插时 NAA 则能够直接作用于形态学上端而使之发根。

表 2　下胚轴不同插向对不定根发生的影响

Table 2　Effect of direction of segment inserted on adventitious root formation

| 发根能力 Rooting capacity | 黄瓜（*Cucumis sativus* L.） | | | 绿豆（*Viga radiata* R. Wilozak） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 上段 Apical segment | 中段 Middle segment | 下段 Basal segment | 上段 Apical segment | 中段 Middle segment | 下段 Basal segment |
| 正插 Upright | 95.2 ± 4.6 | 88.8 ± 3.4 | 83.5 ± 3.7 | 91.5 ± 5.1 | 96.0 ± 5.5 | 98.2 ± 4.7 |
| | 5.6 ± 0.7 | 3.7 ± 0.2 | 2.8 ± 0.1 | 3.9 ± 0.5 | 3.2 ± 0.3 | 2.9 ± 0.2 |
| 反插 Upside-down | 97.9 ± 7.2 | 95.1 ± 5.4 | 93.3 ± 5.0 | 87.3 ± 4.8 | 97.7 ± 5.8 | 100.0 ± 0.0 |
| | 2.8 ± 0.5 | 2.9 ± 0.2 | 3.1 ± 0.3 | 2.4 ± 0.2 | 3.3 ± 0.2 | 3.9 ± 0.3 |

注：培养 6 d 时统计数据。表中第一行数据为发根率（%），第二行数据为每个切段的发根数。

Note：Data calculated at the 6th day after culture. The first line of data represents the percentage of rooting（%），the second line of data represents the number of rooting per segment.

表 3　NAA 对下胚轴不定根发生的诱导作用

Table 3　Induction of NAA on rooting on hypocotyl segments

| NAA 浓度/mgL$^{-1}$ NAA concentration /mgL$^{-1}$ | 黄瓜（*Cucumis sativus* L.） | | 绿豆（*Vigna radiata* R. Wilozak） | |
|---|---|---|---|---|
| | 正插 Upright | 反插 Upside-down | 正插 Upright | 反插 Upside-down |
| 0 | D | D | D | D |
| 0.01 | D | DU（66.7%） | D | D |
| 0.025 | D | DU（83.3%） | D | DU（40.0%） |
| 0.05 | D | DU（100.0%） | D | DU（100.0%） |

注：培养 6 d 时统计的发根率数据。“D”表示形态学下端发根；“DU”表示形态学上下两端均发根。

Note：Data calculated at the 6th day after culture.“D”represents rooting on the morphologically lower side；“DU”represents rooting on both morphological sides.

添加 TIBA 条件下，与无激素对照相同，不定根的发生也均限于切段的形态学下端。从表 4 可知，随培养基中 TIBA 浓度的逐步提高，对不定根发生的抑制作用越来越明显，当 TIBA 达 2.0 mg/L 的水平，几乎完全抑制了发根。另外，TIBA 对正插情况下不定根发生的抑制作用强于反插时的情况，推测这可能是由于切段正插时培养基中的 TIBA 可直接作用于发根部位的缘故，而反插时培养基中的 TIBA 需要由接触培养基的形态学上端通过切段运输至形态学下端后才能发挥作用，这样到达发根部位的 TIBA 的浓度就会有所减少。

表 4　TIBA 对下胚轴不定根发生的抑制作用

Table 4　Inhibition of TIBA on rooting on hypocotyl segments

| TIBA 浓度/mgL$^{-1}$ TIBA concentration /mgL$^{-1}$ | 黄瓜（*Cucumis sativus* L.） | | 绿豆（*Vigna radiata* R. Wilozak） | |
|---|---|---|---|---|
| | 正插 Upright | 反插 Upside-down | 正插 Upright | 反插 Upside-down |
| 0.1 | 90.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 0.2 | 75.5 | 100.0 | 70.0 | 90.0 |
| 0.5 | 30.0 | 80.0 | 35.0 | 70.0 |
| 1.0 | 0 | 10.0 | 10.0 | 65.0 |
| 2.0 | 0 | 0 | 0 | 17.5 |

注：表中数据为培养 6 d 时的发根率（%）。Note：Rooting percentage was calculated at the 6th day after culture.

## 3　讨论

本文在对黄瓜和绿豆下胚轴不定根发生的研究中，观察到了一些值得注意的现象。（1）在不定根发生的时间上，培养第 4 d 即可明显地观察到形态学变化，说明在离体培养的下胚轴中，不定根原基的启动是非常迅速的。（2）下胚轴不同部位的发根能力有明显差异，植物种类也有一定影响，发根率并不与发根数相关（表 1）。提示研究发根能力时还应注意到发根率和发根数二方面。（3）在无 NAA 诱导情况下，无论正插还是反插，黄瓜和绿豆下胚轴都只能在其形态学下端发根，当培养基中添加 NAA 达到一定浓度时，又都可以诱导反插的下胚轴切段在其形态学上端发根。上述现象与李小芳等（2000）在大白菜、Klerk 等（1995）在苹果上观察到的结果是一致的，说明在不同植物种类之间，下胚轴切段不定根发生具有规律性表现。

关于不定根发生的机理，有人认为取决于内源 IAA 的浓度梯度。把一根下胚轴切成上、中、下 3 段，其中的每一切段都有形态学上端和下端之分。从内源 IAA 分布来看，相邻两个切段切口处（即上一切段的形态学下端和下一切段的形态学上端）的 IAA 含量水平应该是一致或相差很小的，可为什么在无外源 NAA 诱导下，不定根却总是在形态学下端发生呢？显然这是不能单纯用内源 IAA 浓度梯度来解释的，本文实验结果也说明了这一点。

根据本文实验结果，我们认为生长素极性运输活性在下胚轴不定根发生中起着重要作用。理由如下：图 1 表明下胚轴切段只能在形态学下端形成不定根；表 2 和记录结果进一步表明反插的下胚轴切段在形态学下端的发根速率比正插下端的要快 1～2 d，由于培养基中未添加外源激素，推测是由于正插的切段下端切面接触培养基时可能存在向下极性运输的内源生长素的外流；表 3 显示外源添加 NAA 可以克服切段形态学上端不能形成不定根的障碍，提示切段形态学上端在无激素条件下不能形成不定根与形态学上端的内源生长素

活性不足有关；表 4 显示无论是正插还是反插，外源 TIBA 的供应均显著抑制切段不定根形成，直至不定根形成率为 0%，这提示 TIBA 对内源生长素诱导不定根的启动起了负调控作用。

早在 20 世纪 70 年代，Haissing（1974）就报告过生长素能诱导根原基形成，因此上节分析认为切段形态学上端不能发根与内源生长素活性不足有关是有依据的，问题在于为何会发生不足？De Klerk 等（1995）指出不定根的形成过程可划分为去分化、诱导和分化 3 个阶段，诱导阶段需要生长素，时间约为 24 ~ 48 h。这提示，在胚轴切段发根培养初期，在切面处（或切面内侧）应该含有足够水平的内源生长素活性。而 TIBA 对内源生长素的影响主要是抑制 IAA 的生物合成或加速 IAA 的降解（赵仲仁等，1995），从而使内源游离 IAA 水平降到极低（Audus 等，1956）。Shinkle 等（1998）曾报道微量 TIBA 即可抑制胚轴内 IAA 的向基运输，Geier 等（1990）报道 TIBA 抑制细胞内的 IAA 外流从而抑制 IAA 在植物体内的移动。上述表明 TIBA 不仅能够抑制内源 IAA 的运输，而且是在细胞水平上调控组织内不同细胞间的内源 IAA 水平。TIBA 处理使内源 IAA 水平下降到极低有一个时间过程，而内源 IAA 启动不定根发生的有效作用时间是在不定根形成过程的早期，因而可以认为 TIBA 处理抑制胚轴切段不定根发生的主要原因是抑制了内源 IAA 的移动和再分布。

根据本文实验结果，我们可形成以下认识：1. 胚轴切段培养物中（至少在培养初期）存在内源生长素的极性运输，否则 TIBA 不会起抑制不定根发生的作用。2. 胚轴切段的形态学上端不能形成不定根的原因，是由于自身所含内源生长素已按极性运输规律向下运输至形态学下端而切离的胚轴已不可能再从上方（生长点）获得内源生长素；这也就是外源 NAA 可以使切段形态学上端 100%形成不定根的原因。从这一认识出发也就可以顺理成章地解释同一胚轴上的各个切段都只能在切段的一端（形态学下端）形成不定根。3. TIBA 处理能抑制具有充分生长素活性的切段在形态学下端发根，表明不定根的启动还需要有细胞间生长素存在的重新定位，即及时调整反应细胞的内源生长素水平。

影响不定根发生的因素很多，最近有人报道乙烯、乙烯合成作用的抑制剂、BA、ABA 等一些生长调节剂，以及多胺生物合成抑制剂、二硫苏糖醇（DTT）等可促进或抑制不定根的形成（王水等，1997；Wisser 等，1996；Ma 等，1998；Fromon 等，1997；Davis 等，1997；Auderset 等，1997）。这些报道所涉及的因素都未见有和极性相关的报道。这表明不定根发生的规律和机理中，极性只是其中一个重要方面。由此可见，不定根的发生并非是一个简单的过程，关于不定根发生的规律和机理还需要更多更细致的工作。

## 〔参　考　文　献〕

Auderset G，Moncousin C，O′Rourke J *et al*，1997. Stimulation of root formation in difficult-to-root woody cuttings by dithiothreitol [J]. *Int J Plant Sci*，**158**：132—135

Audus LJ，Thresh R，1956. The effects of synthetic growth-regulators on the level of free endogenous growth – substances in plant [J]. *Ann Bot*，**20**：439—459

Davis DJ，1997. Polyamines，auxins and organogenesis in leafy spurge（*Euphorbia esula* L.）[J]. *J Plant Physiol*，**151**：603—609

De Klerk GJ，Kappi M，Brugge JT，*et al*，1995. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings [J]. *J*

*Exp Bot*，**46**：965—972

Devier CL，Geneve RL，1997. Flowering influences adventitious root formation in chrysanthemum cuttings [J]. *Sci Hort*，**70**：309—318

Fromon J，Meyer AJ，Weisenseel MH，1997. Growth，membrane potential and endogenous ion currents of willow（*Salix viminalis*）roots are affected abscisic acid and spermine [J]. *Physiol Plant*，**99**：529—537

Geier V，Werner O，Popp M，1990. Indol-3-acetic acid uptake in isolated protoplast of the moss *Furnaria hydrometrica* [J]. *Physiol Plant*，**80**：584—592

Haissing BE，1974. Influences of auxins and auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development [J]. *N Z J For Res*，311

Jarvis BC，Shannon P，Yasmin S，1983. Involvement of polyamine with adventitious root development in stem cuttings [J]. *Plant Cell Physiol*，**24**：677—683

Li XF（李小芳），He YK（何玉科），Tang ZC（汤章城），2000. Effect of IAA and stimulated microgravity on formation of adventitious roots of Chinese cabbage [J]. *Acta Bio Experi Sinica*（实验生物学报），**33**：179—185

Ma JH，Yao JL，Cohen D，*et al*，1998. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures [J]. *Plant Cell Rept*，**17**：211—214

Pelosi A，1995. Hormonal control of root primordial differentiation and root formation in cultured explants of *Eucalyptus globules seedlings* [J]. *Aust J Plant Physiol*，**22**：409—415

Shinkle JR，Kadakia R，Jones AM，1998. Dim-red-light-induced increase in polar auxin transport in cucumber seedlings. 1. Development of altered capacity，velocity，and response to inhibitors [J]. *Plant Physiol*，**116**：1505—1513

Tian CE（田长恩），Ye H（叶蕙），Li RJ（李人圭），*et al*，1998. Changes of content polyamines and solubleprotein and activity of peroxidase during adventitious root formation in cotyledons of *Cucumis meio* cultured *in vitro* [J]. *Plant Physiol Commun*（植物生理学通讯），**34**：105—107

Vesperinas ES，1998. In Vitro root induction in hypocotyls and plumule of *Helianthus annuus* [J]. *Envir and Experi Bot*，**39**：271—277

Wang LL（王利琳），Hu JQ（胡江琴），Liang HM（梁海曼），2000. Studies on adventitious root formation in cotyledons of Cucumber cultured in vitro [J]. *Biotech*（生物技术），**10**：3—6

Wang S（王水），Xia YJ（夏勇炯），Wei F（魏峰），*et al*，1997. Tissue culture and plant regeneration of *Taxus yunnanensis* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究），**19**：407—410

Wisser EW，Cohen JD，Barendas GN，*et al*，1996. An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded Rumex palustria Son [J]. *Plant Physiol*，**12**：1687—1692

Zhao ZR（赵仲仁），Li GR（李广仁），Huang KQ（黄桂琴），*et al*，1997. Effects of some inhibitors on potassium and IAA-induced adventitious root formation of excised cucumber cotyledon [J]. *Acta Botanica Sinica*（植物学报），**39**：64—67